

GlutenTox® Sticks Plus

Test rápido para la determinación del contenido de gluten

Ed.2 - Diciembre 2012

(Cat. No. KT-5340)

GlutenTox® Sticks Plus

Test rápido para la determinación del contenido de gluten

Contenidos

1. Uso previsto

GlutenTox® Sticks **Plus** es un test inmunocromatográfico que permite la determinación de gluten inmunotóxico dañino para celíacos en todo tipo de alimentos, bebidas, otros productos de consumo y la detección de gluten en superficies.

2. Introducción

La celiaquía es una enfermedad que afecta al intestino delgado provocando la atrofia de las vellosidades intestinales, lo que interfiere en la absorción de nutrientes tales como proteínas, grasas, hidratos de carbono, sales minerales y vitaminas. Dicha enfermedad se debe a una respuesta inmunológica inapropiada al gluten (mezcla de proteínas presente en cereales) de trigo, cebada, centeno y, en menor medida, de avena [ref. 1 y 2], pudiendo producir diarrea, deficiencia de vitaminas y minerales, anemia y osteoporosis. La celiaquía afecta a personas de todas las edades.

En la actualidad, el único tratamiento del que disponen los enfermos celíacos es seguir una dieta estricta sin gluten durante toda su vida, un hecho que presenta grandes dificultades en la práctica, sobre todo si tenemos en cuenta que el gluten, además de estar presente en multitud de alimentos, lo está también en aditivos y conservantes.

Según la Comisión del Codex Alimentarius y el Reglamento (CE)41/2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten, para considerar un alimento "exento de gluten" (según el Codex) o "sin gluten" (según el Reglamento CE), éste debe tener un contenido de gluten inferior a 20 partes por millón (ppm*).

*Miligramos de gluten por kilogramo de alimento.

3. Fundamento del test

GlutenTox® Sticks **Plus** es un test inmunocromatográfico que permite determinar la cantidad de gluten en muestras de alimentos de todo tipo, desde materias primas hasta alimentos procesados y/o tratados con calor y, también, de productos de consumo de riesgo para los celíacos.

GlutenTox® Sticks **Plus** puede aplicarse, además, a la detección de gluten en superficies, lo que permite llevar a cabo un control de la limpieza de las zonas de producción, requisito indispensable para prevenir el riesgo de contaminación en el producto final.

Este test es especialmente útil en el control rutinario de las empresas agroalimentrarias para asegurar que sus productos cumplen con el programa de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC), así como para garantizar su correcto etiquetado. Permite, además, la toma rápida de decisiones y acciones correctivas cuando se haya producido alguna contaminación a lo largo de la cadena de producción.

En todos los métodos de análisis de gluten, en primer lugar, se procede a la extracción del gluten de las muestras, siendo éste uno de los puntos más críticos. La solución de extracción UGES proporcionada en este kit es válida para todo tipo de alimentos gracias a la combinación de agentes disgregantes, reductores y solubilizantes. Para el análisis de alimentos con polifenoles o taninos, como son el chocolate, té, café, vino, maíz morado y fibra de maíz, soja, frutos rojos, etc., es necesario añadir un aditivo especial en el proceso de extracción, con objeto de evitar las interferencias de estos compuestos que actúan como agentes quelantes de proteínas (ver Figura 1). Lo mismo ocurre en el caso de productos cosméticos con compuestos antioxidantes como son las vitaminas A, C y E, los carotenos, carotenoides, etc. Tras la extracción, en la etapa de detección, la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos monoclonales anti-gliadina 33-mer unidos a microesferas rojas) previamente fijados en la tira [ref. 3]. Este complejo avanza por capilaridad a lo largo de la tira.

Para indicar que el resultado es positivo, una línea de color ROJO aparecerá en la zona de resultado de la tira. La ausencia de esta línea indica un resultado negativo. Independientemente de que haya presencia o no de gluten, la mezcla de conjugado va avanzando por la tira hasta la región de control donde se han inmovilizado anticuerpos que deben atrapar las microesferas conjugadas azules, por lo que si el test se ha realizado correctamente, deberá aparecer una línea de color AZUL (línea de control). La aparición de esta línea se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) para indicar que el flujo ha sido el apropiado; y 3) como control interno de los reactivos. Si la línea azul no aparece, el test debe considerarse inválido.

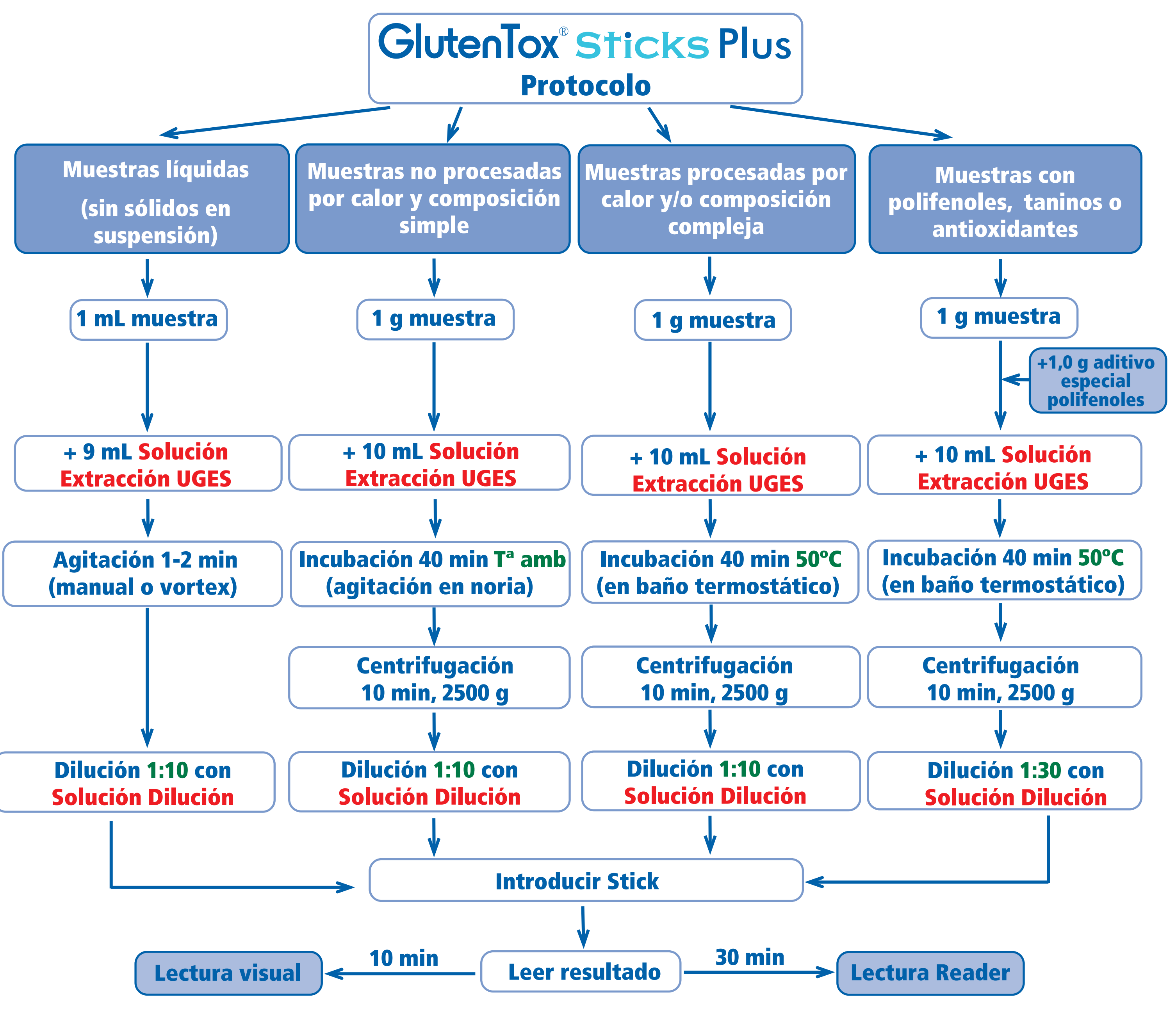


Figura 1. Esquema del protocolo de uso de las tiras GlutenTox® Sticks Plus

Esta técnica admite dos alternativas para llevar a cabo la lectura final de la tira immunocromatográfica: lectura visual o lectura mediante el uso de un lector de tiras GlutenTox® Reader (ver Anexo). La lectura visual es válida para aplicaciones en las que se requieran resultados semicuantitativos. Para obtener resultados cuantitativos es necesario utilizar un lector cromatográfico con alta sensibilidad. El lector de tiras inmunocromatográficas GlutenTox® Reader satisface esos requerimientos mediante la combinación de un detector óptico de alta sensibilidad, un sistema electrónico integrado y un sistema efectivo de procesamiento de datos. Además, este lector cumple con la normativa europea de marcado CE y ha sido fabricado de acuerdo con las Normas ISO 9001 e ISO 13485.

4. Condiciones de almacenamiento y estabilidad

Se debe almacenar el producto entre 2 y 30 °C en su envase original, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No debe abrirse hasta el momento de su uso.

Muy importante: mantenga siempre bien cerrado el tubo con las tiras. Una vez que el sellado se rompe, conserve el tubo con las tiras a temperatura ambiente, nunca lo congele o lo refrigere, de esta forma evitará la condensación de agua.

5. Precauciones

- Sólo para analizar alimentos, bebidas, otros productos de riesgo para los celíacos y superficies.
- No ingerir ninguna solución (líquido) y/o aditivo del kit.
- No usar ningún elemento del kit después de la fecha de caducidad.
- Se recomienda el uso de guantes desechables sin polvo.
- Sólo toque las tiras con guantes o con las manos limpias. Evite, en todo caso, tocar la zona absorbente de la parte inferior de la tira ya que esto puede conducir a la aparición de falsos positivos.
- Si un alimento consta de varias partes, asegúrese de tomar una muestra representativa de cada una y de preparar una muestra final homogénea. Si no lo hace así y el gluten estuviera distribuido desigualmente en el alimento, podría obtenerse un falso negativo.

6. Materiales suministrados

- GlutenTox® Sticks (25 tiras).
- Solución de Extracción UGES (Universal Gluten Extraction Solution) (250 mL).
- Solución de Dilución (30 mL).
- Tiras multipocillo (4 tiras x 8 pocillos).
- Control Positivo (harina de trigo, 10 g).
- Control Negativo (harina de maíz, 10 g).
- Instrucciones de uso.

7. Materiales necesarios no suministrados

- Balanza analítica (precisión 0,1 g).
- Tubos de ensayo con tapón (>10 mL).
- Viales de ensayo.
- Pipetas y puntas.
- Vórtex (opcional).
- Agitador de noria o similar.
- Baño termostático (no necesario en muestras no procesadas por calor y de composición simple).
- Centrífuga (opcional).
- Guantes desechables.
- Agua destilada.
- Cronómetro.

Para **alimentos con polifenoles o taninos y productos cosméticos con antioxidantse** se requieren los siguientes materiales adicionales disponibles en el catálogo de Biomedal* (RS-5320):

- Aditivo especial polifenoles (25 g).
- Control Positivo especial polifenoles (cacao con gluten, 10 g).
- Control Negativo especial polifenoles (cacao sin gluten, 10 g).

! NOTA: Alimentos ricos en polifenoles o taninos son: chocolate, té, café, vino, maíz morado y fibra de maíz, soja, frutos rojos, etc.

! NOTA: Los antioxidantes más frecuentes en productos cosméticos son las vitaminas A, C y E, los carotenos, carotenoides, etc.

* Para más información consulte con su proveedor.

8. Preparación de muestras de alimentos, bebidas y otros productos de consumo

8.1. Muestras sólidas

1. Homogeneice y/o triture la muestra.

2. Pese 1 g de muestra en un tubo de ensayo.

! NOTA: Si la muestra, sea sólida o líquida, contiene polifenoles, taninos (ej. chocolate) o antioxidantes, pese y añada al tubo con la muestra 1,0 g de Aditivo especial polifenoles.

3. Añada 10 mL de Solución de Extracción UGES. Cierre el tubo y mezcle para homogeneizar (por ejemplo, usando un vórtex). Para preparar los controles positivo y negativo, siga el mismo procedimiento.

4. Dependiendo de la complejidad de la matriz de la muestra y de si la muestra de alimento ha sido procesada o no por calor, el proceso de extracción puede requerir o no tratamiento térmico (ver Figura 2):

a) Muestras no procesadas por calor y de composición simple

Incubar la muestra durante 40 minutos a temperatura ambiente mediante el uso de un agitador de noria.

b) Muestras procesadas por calor y/o de composición compleja

Incubar la muestra a 50ºC en un baño termostático durante 40 minutos, agitando el tubo periódicamente por inversión o con un vórtex.

c) Muestras con polifenoles, taninos o antioxidantes

Incubar la muestra a 50ºC en un baño termostático durante 40 minutos, agitando el tubo periódicamente por inversión o con un vórtex.

! NOTA: Ante la duda del tipo de muestra a analizar, se recomienda el uso de calor para favorecer la extracción (opción b).

5. Clarifique la muestra por decantación o centrifugación.

6. Pase la muestra clarificada a un tubo limpio.

! NOTA: Las muestras clarificadas deben analizarse tan pronto como sea posible.

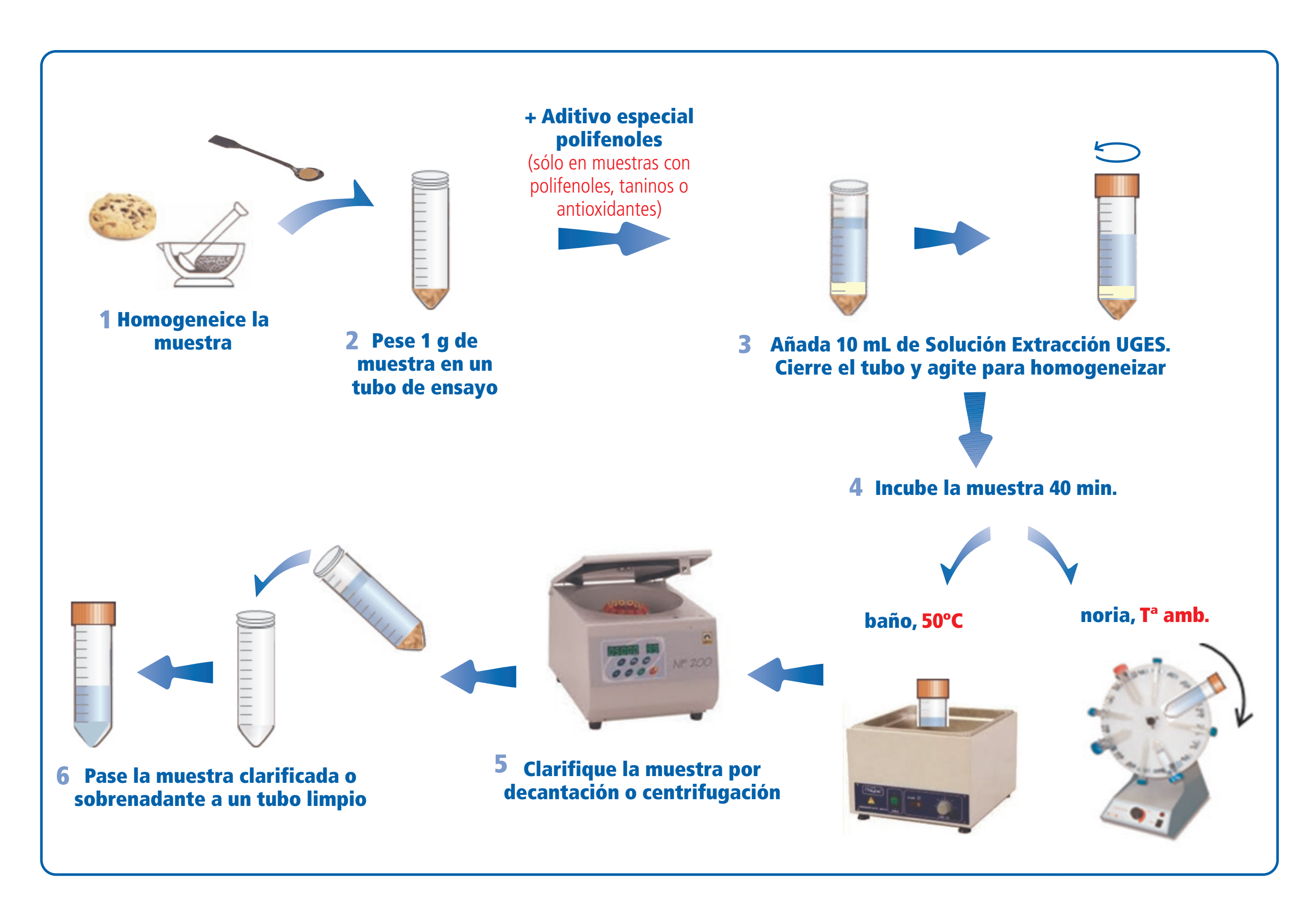


Figura 2. Esquema del procedimiento de extracción de muestras sólidas

8.2. Muestras líquidas

! NOTA: Muestras líquidas con polifenoles, taninos o antioxidantes deben analizarse según lo indicado en el apartado 8.1.Muestras sólidas.

Las muestras líquidas tales como leche, zumos, bebidas carbonatadas (refrescos), bebidas ecológicas (de soja, arroz, avena, espelta), cervezas y caldos no requieren una extracción intensiva, siendo suficiente con 1-2 minutos de agitación manual, y tampoco requieren de un paso final de decantación o centrifugación.

1. Añada 1 mL de muestra en un tubo de ensayo.

2. Añada 9 mL de Solución de Extracción UGES. Cierre el tubo y mezcle para homogeneizar (por ejemplo, usando un vórtex).

3. Agite la muestra manualmente (de forma vigorosa) o mediante un vortex, durante 1-2 minutos.

! NOTA: Las muestras clarificadas deben analizarse tan pronto como sea posible.

9. Implementación de la prueba analítica tras la extracción

1. Acondicione a temperatura ambiente (20-26ºC) las muestras y controles clarificados, la Solución de Dilución y el tubo con las tiras GlutenTox®Sticks.

2. Diluya la muestra con Solución de Dilución en tubos o viales de ensayo. Un volumen final de 900-1000 µL es suficiente para realizar el ensayo.

Dilución	Volumen de Muestra extraída	Volumen de Solución Dilución
1:10	100 µL	900 µL
1:30	30 µL	870 µL
1:60	15 µL	885 µL
1:100	10 µL	990 µL
1:300	3 µL	897 µL

Si se desconoce por completo la cantidad de gluten que se espera encontrar en la muestra, se recomienda realizar el ensayo con la menor dilución (1:10) para trabajar al máximo de sensibilidad. En caso de que se obtenga un resultado positivo (aparición línea ROJA), puede repetirse el ensayo realizando diluciones mayores para tener una estimación semicuantitativa más acotada del rango de concentración de gluten presente en dicha muestra (véase apartado 13 "Características analíticas").

! NOTA: Si se trata de una muestra con polifenoles, taninos o antioxidantes y por tanto en la etapa de extracción ha añadido el aditivo especial polifenoles, la dilución mínima de ensayo es de 1:30. Nunca realizar en estos casos diluciones menores (es decir, dilución 1:10), ya que la presencia del aditivo especial polifenoles repercute en el buen funcionamiento de la tira si se realiza una dilución menor de 1:30.

! NOTA: En las muestras con alto contenido en grasas, evitar coger la capa de grasa sobrenadante.

! NOTA: Las diluciones de las muestras deben analizarse en un corto espacio de tiempo, y el material restante no se puede conservar.

3. Deposite 100 µL de la muestra diluida en uno de los pocillos de las tiras multipocillo suministradas en el kit.

4. Abra el tubo con los GlutenTox® Sticks, saque las tiras necesarias e inmediatamente cierre el tubo.

5. Introduzca la tira verticalmente en el pocillo de ensayo con la muestra diluida.

6. Espere 10 minutos y lea el resultado en la tira.

! NOTA: En caso de usar GlutenTox® Reader para llevar a cabo la lectura de la tira, debe realizarse una dilución 1:10 de la muestra y esperar un mínimo de 30 minutos y un máximo de 2 horas.

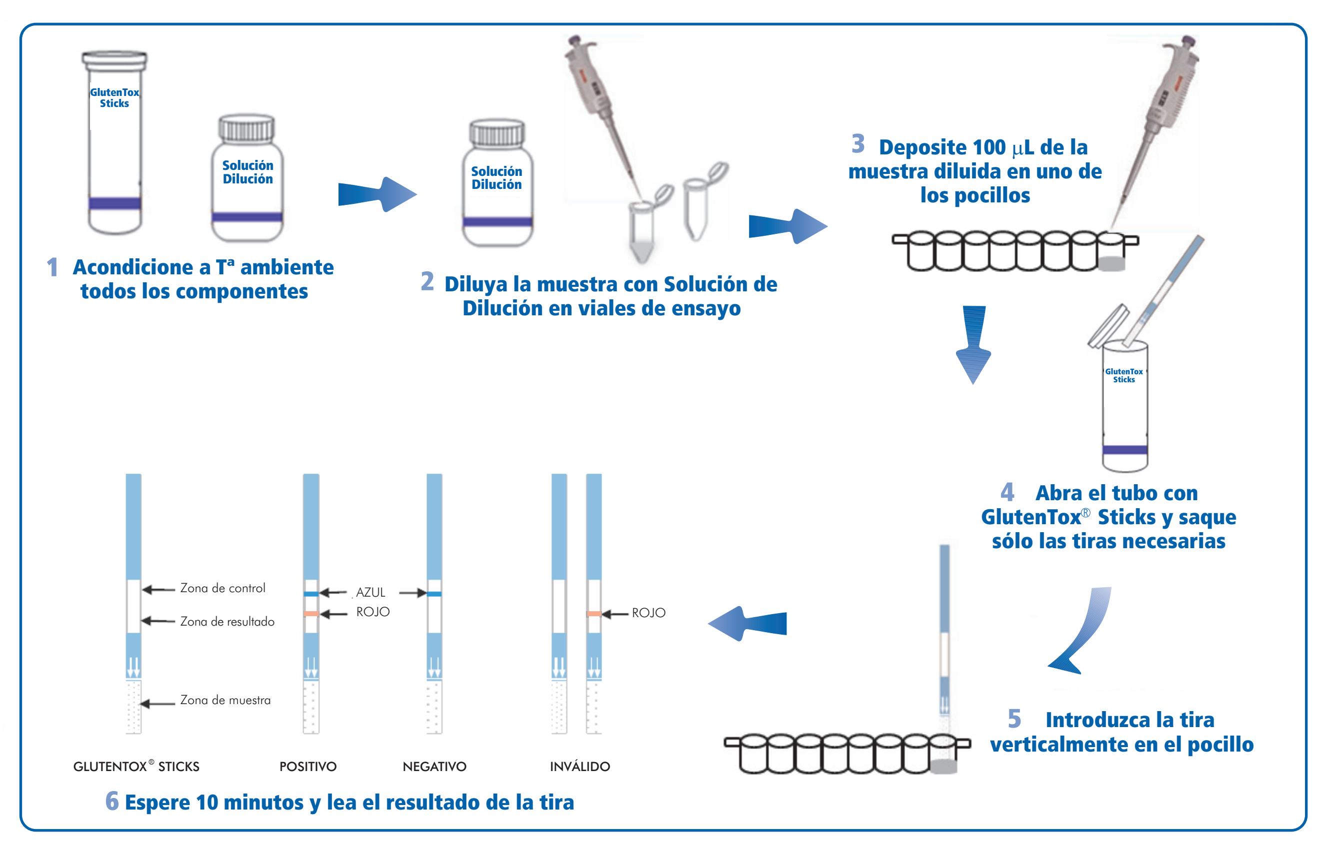


Figura 3. Esquema del procedimiento de análisis de la muestra

10. Análisis de superficies

1. Acondicione a temperatura ambiente (20-26°C) la Solución de Dilución y el tubo con las tiras GlutenTox® Sticks.

2. Restriegue el extremo inferior de la tira por la cara algodonosa por una superficie mínima de 16 cm² o por una lína de 40 cm (Ver Figura 4).

3. Deposite 100 µL de la Solución de Dilución en uno de los pocillos suministrados en el kit.

4. Introduzca la tira verticalmente en el pocillo de ensayo, una vez restregada por la superficie a analizar.

5. Espere 10 minutos y lea el resultado en la tira.

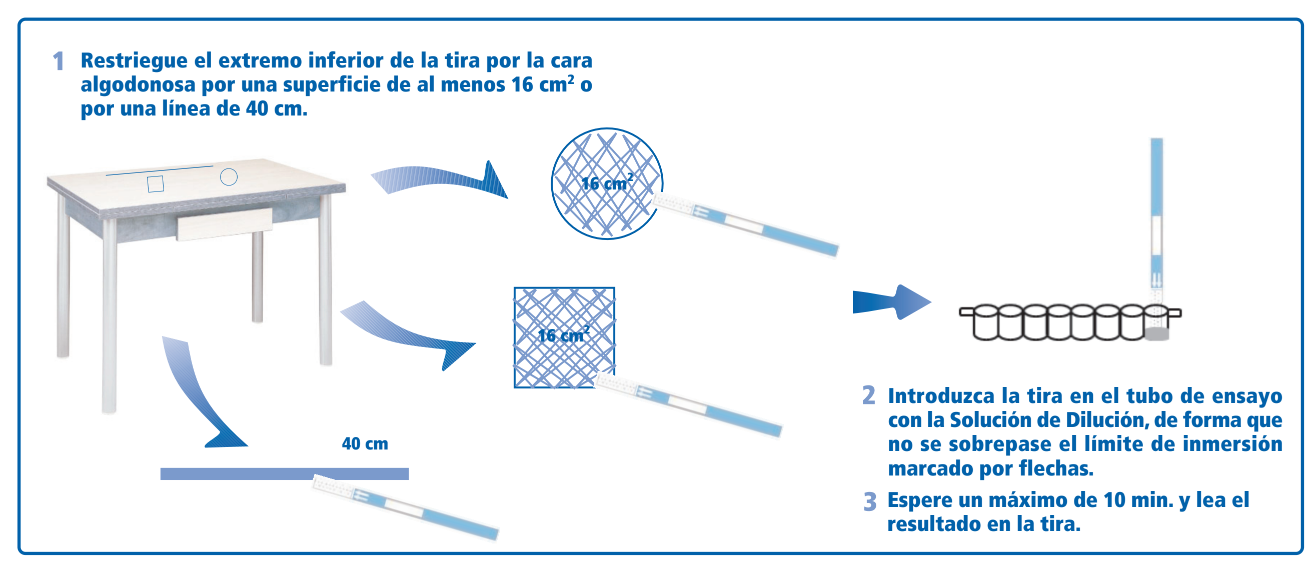


Figura 4. Esquema del procedimiento de análisis de superficies

11. Interpretación de resultados

NEGATIVO: Una sola línea de color AZUL (línea de control) aparece en la parte central de la tira (zona de control).

POSITIVO: Además de la línea de control (AZUL), también aparece una línea de color ROJO (línea de resultado) en la zona de resultado.

> **! NOTA:** La intensidad de la línea de color rojo en la zona de resultado de la tira puede variar en función de la concentración de gliadina presente en la muestra.

INVÁLIDO: Cuando la línea de control (AZUL) no aparece independientemente de que aparezca o no la línea de resultado (ROJO). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: una cantidad insuficiente de volumen de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si persistiese el problema, debe contactar con su proveedor.

12. Control de calidad

El control interno de funcionamiento viene incluido en el test. La línea azul que aparece en la zona de control es el control interno del proceso. Éste comprueba que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

13. Características analíticas

Se han realizado ensayos con objeto de caracterizar los principales parámetros analíticos del ensayo: sensibilidad y especificidad.

Sensibilidad

El límite de detección de la tira inmunocromatográfica es de 15 ng/mL de gliadina.

<u>Ensayo de análisis de alimentos, bebidas y otros productos de consumo</u>

En cuanto a las ppm de gluten, el límite de detección del ensayo dependerá de la dilución realizada con la muestra clarificada después de la extracción.
En la Tabla 1 se esquematiza la dilución que se ha de realizar según el nivel de gluten que se quiera detectar.

Tabla 1. Límite de detección según la dilución de ensayo

		Límite Detección / ppm Gluten				
		Diluciones				
		1:10	1:30	1:60	1:100	1:300
Resultado del test	Positivo	> 3 ppm	> 10 ppm	> 20 ppm	> 30 ppm	> 100 ppm
	Negativo	< 3 ppm	< 10 ppm	< 20 ppm	< 30 ppm	< 100 ppm

Ensayo de análisis de superficies

El resultado obtenido del ensayo es la presencia o ausencia de gluten por la superficie analizada, no pudiéndose extrapolar a valores de ppm de gluten.

Analizando una superficie de 16 cm^2 o una línea de 40 cm, el test es capaz de detectar un mínimo de 10 ng/cm^2. Por tanto, se puede estimar que si la superficie de trabajo examinada tiene por ejemplo una dimensión de 1.000 cm^2 (40 cm x 25 cm) y el análisis ha salido negativo, trabajando en dicha superficie con una masa alimentaria de 1 Kg se tiene la seguridad de que el producto final tendrá menos de 0,01 ppm (0,01 mg gluten/Kg alimento). Esta cantidad es unas 2.000 veces menos que la cantidad permitida por la normativa europea establecida en 20 ppm (20 mg gluten/Kg alimento) y unas 1.000 veces menos de lo establecido por la Federación de Asociaciones de Celíacos de España (F.A.C.E.) que pone límite de 10 ppm (10 mg gluten/Kg alimento).

Esto significa que el método tiene unos grandes márgenes de seguridad y que su empleo es fiable y puede proporcionar tranquilidad a los clientes, asociaciones de celíacos e inspectores de seguridad alimentaria [ref. 4].

Especificidad

Este test es capaz de detectar específicamente la presencia de la fracción tóxica, para los celíacos, de las prolaminas de trigo (gliadina), centeno (secalina), cebada (hordeína), y también, cantidades suficientemente elevadas de avenas (avenina) que pueden suponer un riesgo para algunos celíacos. Sin embargo, no se observa señal positiva cuando las muestras contienen arroz, maíz, soja, trigo sarraceno, sésamo, mijo, teff, quinoa y amaranto, ingredientes vegetales seguros para los celíacos.

Validación interna

Para garantizar la capacidad del test de analizar todo tipo de alimentos (de naturaleza muy diversa), así como otros tipos de muestras no alimentarias se han ensayado diferentes muestras comerciales. Tras el análisis con GlutenTox® Sticks Plus, en todos los tipos de muestras ensayadas (ver Tabla 2 y 3) se obtuvieron resultados satisfactorios y concordantes con el contenido de gluten encontrado con el método validado por el Codex Alimentarius, lo cual demuestra la aplicabilidad del test sobre un amplio tipo de muestras.

Tabla 2. Muestras alimentarias ensayadas para la validación de GlutenTox® Sticks Plus

Grupo	Muestras
Harinas y sémolas	Harina de maíz, harina de maíz precocida, sémola gruesa de maíz, harina de arroz, harina de trigo, harina de espelta
Leche y productos lácteos	Leche de vaca, leche con fibra soluble, leche con cereales, yogur natural y sabores, queso de untar, mezcla de quesos rallados
Productos de panadería y productos elaborados a partir de cereales	Pan de molde, palillos de pan, galletas María, galletas con chocolate, magdalenas, bizcocho, cornflakes, pastas, tortitas de maíz, tortitas de arroz, tortitas de espelta, snacks
Carnes y productos cárnicos	Carne de pavo picada, carne de pollo picada, embutido de pavo, nuggets de pollo, salchichas de cerdo, chorizo rojo
Pescados y productos de la pesca	Merluza, bacalao
Verduras	Mix de lechugas variadas, revuelto de verduras
Caldos, sopas, cremas y mezclas deshidratadas	Caldo de verduras, sopa de arroz con pollo, sopa de verduras deshidratadas, pastillas de caldo, crema de verduras, crema de cacahuete
Salsas, aderezos, especias y condimentos	Salsa caesar ensalada, salsa de tomate, salsa de soja, aderezo ensalada, ajo en polvo, pimentón en polvo, nata líquida para cocinar
Azúcares	Glucosa líquida, azúcar en polvo
Comidas y platos preparados	Albóndigas en salsa con guisantes, raviolis al huevo con carne, fabada asturiana
Alimentos grasos	Aceite de oliva, aceite de girasol, mantequilla, margarina, nata líquida
Alimentos ácidos	Salsa de tomate, vinagre de vino, vinagre de manzana, zumo de limón
Bebidas	Agua, leche, zumo de frutas, cerveza, bebida de soja, bebida de arroz, bebida de avena, bebidas carbonatadas (refrescos)

Tabla 3. Muestras no alimentarias ensayadas para la validación de GlutenTox® Sticks Plus

Grupo	Muestras
Productos de higiene personal	Gel de baño, champú, desodorante, pasta de dientes, enjuague bucal
Productos cosméticos	Cremas (cara, cuerpo y manos), desmaquillante, cacao o vaselina labial
Otros	Comida animal (pienso seco, comida húmeda), productos de limpieza, medicamentos (comprimidos, cápsulas y jarabes)

14. Referencias

1. Shan L., et al.; "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue"; Science; 2002; 297: 2275-2279.

2. Comino I. et al.; "Diversity in oat potential immunogenicity: basus for the selection of oat varieties with no toxicity"; Gut; 2011; 60:915-922.

3. Moron B., et al.; "Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide", 2008; 87:405-414.

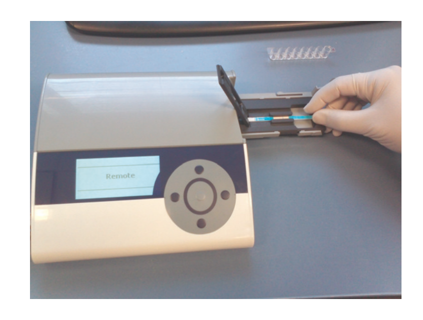
4. Siglez M.A., et al.; "Método de detección de gluten en superficies"; Alimentaria; 2010; 411:67-70.

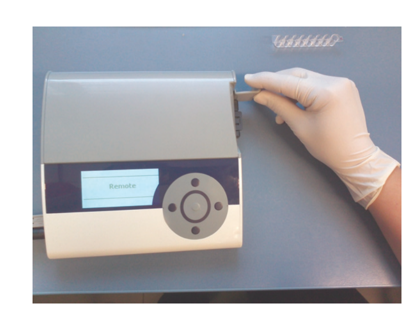
Anexo: Uso del test GlutenTox® Sticks Plus con el lector GlutenTox® Reader

El lector está diseñado para la lectura, exclusivamente, de las tiras inmunocromatográficas de determinación de gluten del test GlutenTox® Sticks Plus, proporcionando datos cuantitativos de la cantidad de gluten presente en las muestras analizadas.

Preparar y realizar el análisis de las muestras siguiendo los puntos 8 y 9 del manual. Una vez realizado el protocolo y pasado el tiempo de incubación necesario, se procede a la introducción de los datos de la muestra en el lector, y a la lectura de la tira para obtener el dato cuantitativo del contenido de gluten de la muestra. Para ello, se resumen a continuación los pasos que debe realizar:

1. Introduzca la tira en el carril de inserción de tiras del lector.





2. En caso de utilizar el lector de forma autónoma, introduzca los datos de la muestra y pulse "measurement/lectura". Inmediatamente comenzará la lectura de la tira.

3. Los resultados de la lectura aparecerán en la pantalla una vez finalizada la misma.

4. En el caso de utilizar el lector asociado a un ordenador utilice el programa LF para asignar la identidad de la muestra y comenzar la lectura.

! NOTA: Más detalles sobre el manejo del lector se encuentran en el manual de instrucciones proporcionado al adquirir el lector GlutenTox® Reader.